

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

84084

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 23.12.1971 (P. 152446)

Pierwszeństwo: 24.12.1970 Republika Federalna
Niemiec

Zgłoszenie ogłoszono: 25.05.1973

Opis patentowy opublikowano: 25.02.1977

MKP C12k 7/00

Int. Cl.² C12K 7/00

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Bayer AG, Leverkusen (Republika Federalna Niemiec)

Sposób otrzymywania roztworów wirusa pomoru świń

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania roztworów wirusa pomoru świń.

Znane są sposoby otrzymywania w większej ilości wirusa pomoru świń przez rozmnażanie wirusa w hodowlach komórkowych. Sposób taki opisuje: Lang, R. Leftheriotis E. Mackowiak, C. w C. R. Akad. Sci. (France) 251, 1993 (1960) i P. Carmenes, M. W. Swangard, O. Arabruster w Panorama Vet. 1968 7677. Stosowane dotychczas sposoby można podzielić na 2 główne grupy.

— Rozmnażanie wirusa w hodowli komórkowej typu hodowli w jednej warstwie komórek, przy czym stosuje się świeżo spreparowane komórki odpowiednich narządów zwierząt (kultura komórek pierwotnych) lub linii komórek, które rozmnaża się przez wiele pokoleń. Po uformowaniu się gęstej warstwy komórek zakaża się je wirusem pomoru świń i po kilku dniach odbiera się wirus ze środowiska w którym się nagromadził.

— Rozmnażanie wirusa w zawiesinowych hodowlach komórek. Zawiesinę komórek otrzymuje się albo z jednowarstwowej hodowli komórek lub bez wstępnej hodowli bezpośrednio ze świeżo ubitych zwierząt. Komórki, znajdujące się w zawiesinie, zakaża się wirusem bez uprzedniego ich rozmnażania i służą one następnie do rozmnażania wirusa.

Opisane sposoby wymagają specjalnej techniki i wystarczają do wytwarzania wirusa w ilościach, potrzebnych do produkcji szczepionek przeciwko pomorowi świń, zawierających żywy wirus. Czas

2

przeżycia tych komórek po zakażeniu wirusem wynosi 2—5 dni. Wstępna hodowla komórek jest pracochłonna i droga i należy ją prowadzić na bieżąco, w przypadku zapotrzebowania na duże ilości wirusa. Sposób ten jest za drogi do otrzymywania dużych ilości wirusa, stosowanych po zateżeniu do otrzymania inaktywowanych szczepionek.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania roztworów wirusa pomoru świń na drodze infekcji organów świeżo ubitych zwierząt podczas hodowli w zawiesinie, polegający na tym, że tchawice zdrowych świń ubojowych odbiera się bezpośrednio po zabiciu w warunkach aseptycznych i inkubuje się w temperaturze 35—37°C w pożywce, do której wprowadzono w celu zakażenia organów przed inkubacją 50 000—150 000 MLP wirusa pomoru świń na 40 tchawic, odbiera się co 4 dni pożywkę, przechowuje się ją w temperaturze 4°C i zastępuje świeżą pożywką, nie zawierającą wirusa, i po 20 dniach lub po 5-krotnej wymianie pożywki żywotne jeszcze organa odrzuca się i oznacza się stężenie wirusa w odebranych połączonych inkubowanych pożywkach i ewentualnie zateża się pożywkę.

Tchawice do inkubacji wprowadza się także w postaci pojedynczych rozdzielonych pierścieni, a inkubację w pożywce prowadzi się przy zastosowaniu powolnego mieszania i napowietrzania sterylnym powietrzem, zawierającym 5% CO₂.

W odróżnieniu od licznych innych rodzajów wi-

rusa, wirus pomoru świń normalnie nie jest cytopatogeny i dlatego może się rozmnażać przez dłuższy cały czas przeżycia narządu w jego hodowli.

Tchawice świńskie można otrzymać w warunkach sterylnych w większych ilościach w rzeźniach i komórki ich tkanek po umieszczeniu w odpowiednim ciekłym środowisku utrzymują się przy życiu przez 2—3 tygodnie. Dla otrzymywania wirusa należy tylko odbierać w regularnych odstępach czasu od zakażenia pożywkę, zawierającą wirus i zastępować ją świeżą pożywką. Tchawica jest w rzeźni odpadem poubojowym i można ją tam uzyskać w dużej ilości. Po zużyciu zakażonego narządu w ciągu 2—3 tygodni po zakażeniu można go łatwo zastąpić.

Przy przeprowadzaniu sposobu według wynalazku należy postępować następująco: Zamykalne naczynia ze szkła, aluminium lub nierdzewnej stali o pojemności 4 litrów sterylizuje się w zwykły sposób i wypełnia się 2 litrami buforu fosforanowego o wartości $\text{pH} = 7,2$, zawierającego na 1 litr 1×10^6 jednostek penicyliny G (sól sodowa) i 1 g dwuhydrostreptomycyny. W rzeźni pobiera się tchawice u świeżo ubitych świń i uwalnia się od nadmiaru tkanki łącznej. Narząd przemycwa się dwukrotnie sterylną wodą i wkłada się do naczyń w warunkach możliwie najbardziej sterylnych. Każde naczynie zawiera 30—40 narządów. Po natychmiastowym przeniesieniu do laboratorium usuwa się septycznie pozostałości tkanki łącznej i stosuje się do hodowli tkankowej części tchawicy, leżące między pierwszym pierścieniem poniżej krtani (Larynx) i ostatnim pierścieniem powyżej rozwidlenia (Bifurcatio Tracheae). Część tę bez dalszego rozdrobnienia wprowadza się do pożywki, składającej się z 70% bulionu PPLO, 10% wyciągu drożdżowego, 1% glukozy, 20% świeżej surowicy końskiej, 0,005% czerwieni fenolowej oraz 1000 jednostek penicyliny G (sól sodowa) i 1 mg/m/l dwuhydrostreptomycyny.

Bulion PPLO otrzymuje się w sposób niżej podany. Gotuje się 250 g serca bydlęcego w 1 litrze destylowanej wody. Po filtracji w celu oddzielenia resztek mięsa rozpuszcza w przesączu 10 g peptonu bakteryjnego i 5 g NaCl. Doprowadza się ługiem sodowym do wartości $\text{pH} = 7,8$.

W próbie na żywotność narządu oddziela się losowo pojedyncze pierścienie tchawicy i pojedynczo umieszcza się w naczyniu do hodowli. Za pomocą prostego mikroskopu, stosowanego przy pracach w hodowli komórkowej, można obserwować ruch rzęskowy epitelu. Jak długo daje się zaobserwować samodzielny ruch, narząd można stosować do rozmnażania wirusa. Wskazane jest jednak zastąpienie narządu nowym najpóźniej po 3 tygodniach ponieważ, jak stwierdzono, obniża się w tym czasie wydajność wirusa.

Niżej podane przykłady przedstawiają sposób według wynalazku.

Przykład I. W wyżej opisanym naczyniu o pojemności 4 litrów, wykonanym ze stali nierdzewnej, umieszcza się 30 tchawic, pobranych w rzeźni. Po usunięciu tkanki łącznej całe tchawice umieszcza się w butelkach Povitzkiego z pożywką tak, że na

każdą butelkę o pojemności ogólnej 1500 ml przypadają 3 tchawice w 150 ml pożywki. Do pożywki przed jej rozlaniem dodaje się 80000 MLD (MLD = średnia dawka śmiertelna) wirulentnego wirusa pomoru świń. Butelki inkubuje się przez 4 dni w temperaturze 36°C , pożywkę zlewa się w warunkach sterylnych i utrzymuje się w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$. Do każdej butelki wprowadza się 150 ml świeżej pożywki, nie zawierającej wirusa i inkubuje się ponownie przez 4 dni. Następnie zabieg powtarza się do uzyskania pięciu zbiorów pożywki z wirusem i po 20 dniach od infekcji narządy wykazują jeszcze ruch rzęskowy, pomimo to odrzuca się je. Zbiory wirusa łączy się, otrzymując ogółem 7500 ml.

Za pomocą reakcji immunofluorescencyjnej stwierdza się stężenie wirusa, które wynosi 104,3 jednostek infekcyjnych w 1 mililitrze.

Przykład II. Według przykładu I zbiera się i oczyszcza 30 tchawic. Do pożywki przed inkubacją wprowadza się 60000 MLD wirusa pomoru świń. Następnie tchawice rozdziela się na pojedyncze pierścienie i dysperguje się w 1,5 litra pożywki. Pożywka znajduje się w fermentatorze, zaopatrzonym w mieszadło i doprowadzenie gazu, który inkubuje się w temperaturze 36°C . Ciecz miesza się przy 30 obrotach/minutę przy jednoczesnym wprowadzaniu 2 litrów/minutę powietrza z 5% domieszką CO_2 . Po 4 dniach środowisko, zawierające wirus, odsącza się i zastępuje świeżym. Narządy inkubuje się dalej zmieniając pożywkę co 4 dni. Odprowadzone środowiska łączy się i utrzymuje w temperaturze 4°C . Po 5 odbiorach organy odrzuca się, chociaż wykazują one pod mikroskopem ruch rzęskowy. Roztwór, zawierający wirus, wykazuje stężenie wynoszące 104,0 jednostek infekcyjnych na 1 mililitr, oznaczone za pomocą immunofluorescencji.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania roztworów wirusa pomoru świń przez infekcję organów świeżo ubitych zwierząt podczas hodowli w zawiesinie, **znamienny tym**, że tchawice zdrowych świń ubojowych odbiera się bezpośrednio po zabiciu w warunkach aseptycznych i inkubuje się w temperaturze $35-37^{\circ}\text{C}$ w pożywce, do której wprowadzono w celu zakażenia organów przed inkubacją 50 000—150 000 MLD wirusa pomoru świń na 40 tchawic, odbiera się co 4 dni pożywkę, przechowuje się ją w temperaturze 4°C i zastępuje się świeżą pożywką, nie zawierającą wirusa i po 20 dniach lub po 5-krotnej wymianie pożywki żywotne jeszcze organa odrzuca się i oznacza się stężenie wirusa w odebranych połączonych inkubowanych pożywkach i ewentualnie zateża się pożywką.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że tchawice dzieli się na pojedyncze pierścienie, a inkubuje się w pożywce przy dowolnym mieszaniu i napowietrzeniu sterylnym powietrzem, zawierającym 5% CO_2 .